聚唾液酸，一种非 GAGs、非免疫原性生物材料的应用研究进展*

吴剑荣**，彭星桥，詹晓北

（江南大学生物工程学院，糖化学与生物技术教育部重点实验室，无锡，214122）

摘要 聚唾液酸是一种由 N-乙酰神经氨酸连接、电负性的线性同聚物，存在于人体、动物细胞和少数致病菌中，主要以糖蛋白（神经细胞粘附分子）和糖脂形式存在，是一种非糖胺聚糖（GAGs）、非免疫原性、生物可降解的优良生物材料。聚唾液酸可用作组织工程和药物缓释材料，也可以与其它大分子复合形成功能材料。本文对聚唾液酸生物学功能、发酵生产及应用进行概述，以期为聚唾液酸的进一步应用研究提供参考。

关键词 聚唾液酸 非免疫原性 生物材料 药物缓释

中图分类号 R318.08

聚唾液酸（polysialic acid，简称 PSA）是由 N-乙酰神经氨酸单体通过α-2,8 和/或者α-2,9 糖苷键连接而成的线性多聚糖，聚合度通常在 8-400 dp 之间[1]。N-乙酰神经氨酸（NeuAc）是唾液酸的一种结构形式，它是一类 9 碳酮糖酸的衍生物，并且具有吡喃糖环结构的酸性氨基糖，在自然界中广泛分布，主要存在于动物及人体细胞外膜上糖链缀合物末端。对于人类仅含有α-2,8 连接的 PSA（如图 1 所示），且只有刚出生婴儿体内含有大量 PSA，成人只存在于精子顶部、部分癌细胞、阿尔茨海默氏症和帕金森症患者大脑中[2,3]，而在其它动物精子也发现含有聚唾液酸，如海胆[4]。另外一些病原菌也能合成 PSA，例如大肠杆菌 K1、K235 和脑膜炎奈瑟氏菌(B 型)、溶血性曼氏杆菌(A2 型)等可以合成α-2,8 连接的聚唾液酸；C 型脑膜炎奈瑟氏菌可以合成α-2,9 构型的聚唾液酸；大肠杆菌 K92、大肠杆菌 Bos-12 等菌株可以合成α-2,8/α-2,9 交替连接的聚唾液酸。对于大肠杆菌，PSA（K1 多糖）与果糖硫酸软骨素（K5 多糖）、肝素前体（K4 多糖）同属 Group II 荚膜多糖，三者都具有非免疫原特性，但是 PSA 不属于糖胺聚糖类（GAGs），因此 PSA 在人体内不会被糖胺聚糖代谢酶所降解。另外，由于 PSA 主链上每个唾液酸残基都含有羧基，因此 PSA 长链在 pH 小于 7.0 会呈强电负性，也造成 PSA 大分子之间发生静电排斥作用。

图 1 α-2,8 连接构型聚唾液酸的结构

Fig. 1 Structure of α-2,8 linked polysialic acid

* 国家“863”计划资助项目（2012AA021505）

** 通讯作者，电子邮箱：kinowu@jiangnan.edu.cn

由于 PSA 在动物及人体发挥重要生物学功能，目前也能够通过微生物发酵大规模获得 PSA，针对 PSA 的应用也逐渐成为研究热点。本文针对聚唾液酸的生物学功能、发酵生产和应用研究展开叙述，以期更多国内外同行参与相关应用研究和开发。

1 聚唾液酸生物学功能

对于致病菌，PSA 以荚膜多糖形式锚定在细胞膜外表面，与环境直接接触。由于 PSA 结构和人体中的 PSA 是一致的，这使得致病菌可以通过“分子模仿”来逃避宿主巨噬细胞的吞噬作用而侵入宿主。例如，B 型脑膜炎奈瑟氏菌由于存在 PSA，使其到目前为止还无法制备相应的疫苗；再如大肠杆菌 K1 存在于产道，是导致新生儿的脑膜炎、成人的败血症和尿道炎等疾病的主要病因[5]。在人和高等动物体内，PSA 与胚胎形成、神经再生、婴幼儿脑部发育等过程具有很密切的关系，它主要是通过 N-糖苷键连接在脊椎动物的神经粘附分子(NCAM)上，参与神经系统的神经细胞发育和突触形成等，在神经系统的发育中起到重要作用。但是，当大脑发育成熟后，含 PSA 的 NCAM 比例会下降很多[6,7]。另外人乳、小鼠乳等动物乳中都含有 PSA 修饰的 CD36 糖蛋白，对动物脑神经发育和生长具有重要作用[8]。

大量证据表明，唾液酸是精子表面结合的主要糖类，而且也是精子中糖蛋白的主要组分，有关唾液酸之于精子功能和意义非常重要。其中聚唾液酸主要存在于精子的顶部，以糖蛋白形式存在，聚合度约为 45-60 dp；聚唾液酸的存在使得精子能够避开雌性的免疫系统，且由于带有大量负电荷，聚唾液酸还可通过使精子之间相互排斥、不致凝集而对精子起保护作用[9]。一般认为聚唾液酸糖蛋白与精子的运动和胞内信号途径有关，关系男性不孕不育症和动物的繁衍。另外，正常成人组织中的 NCAM 缺乏 PSA 表达，但在一些肿瘤组织中存在 PSA 过量表达，能促进癌细胞的分离、浸润和远端转移，且具有向脑部转移的倾向。研究表明 PSA 的表达与肺癌、喉癌、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、垂体瘤、横纹肌瘤等的恶性程度、浸润、转移相关，可作为肺癌、喉癌、成神经细胞瘤等肿瘤诊断的临床标志物[10,11]。此外，在患有阿尔茨海默氏症和帕金森症患者的大脑中也存在 PSA，但是其生物学功能还未知；有报道认为 PSA 可以结合铜离子，对大脑起解毒作用[12]。

2 聚唾液酸的生产

PSA 主要通过大肠杆菌（K235 和 K1）发酵获得，常采用山梨醇、葡萄糖或木糖为底物[13,14,15]，并进行 pH 控制发酵[16,17]。最近，Zheng 等[18]采用两阶段氨水流加的策略进行 pH 控制来生产聚唾液酸，即前期控制 pH 为 6.4、后期控制 pH 为 7.4，可以使得 PSA 分子量可达 260 kDa。中科院的 Chen 等[19]利用基因工程获得产聚唾液酸工程菌，虽然摇瓶产量为 1.0 g/L，但在 7 L 发酵罐中通过氨水控制 pH 为 7.0 并流加葡萄糖以维持其浓度在 1.0 g/L，使得聚唾液酸达到 16.0 g/L，分子量为 113 kDa。另外，本课题发现磷酸盐能与 PSA 在溶液形成稳定结构，有利于发酵后期提高 PSA 产量和分子量的稳定性[20]。目前，国内已有长兴制药有限公司与江南大学合作，在 5 T 发酵罐规模进行商业化生产。表 1 总结了国内外聚唾液酸发酵的水平和工艺。

针对聚唾液酸纯化，一般采用有机溶剂如乙醇进行沉淀，然后再进行精制，

例如采用体积 3～4 倍的冷乙醇反复沉淀可将聚唾液酸从发酵液中分离 [13]。Puente-Polledo 等[21]采用季铵盐沉淀的方式将聚唾液酸从发酵液中提取出来。PSA 精制一般采用柱层析，如采用 DEAE Sephadex A-25 和 Sephacryl-300 填料[23,24]，但是该工艺较复杂、生产成本较高。Kapre 等[15]通过离子交换和凝胶层析对聚唾液酸进行精制，聚唾液酸纯度达 99%，收率为 55%。本课题组 Liu 等[25]在 500L 发酵罐中进行聚唾液酸试生产，产量达到 5.5 g/L，并研发出一条适用于医药级 PSA 提取和精制工艺路线，主要采用珍珠岩板框过滤除蛋白、CPC 络合和中高速 Super-Q FF 阴离子层析等工艺，最终 PSA 产品内毒素几乎完全去除，达到医药级纯度要求。

表 1 聚唾液酸发酵工艺参数

Table 1 Process parameters of polysialic acid fermentation

菌株	碳源	发酵策略	PSA	分子量	文献
E. coli K235	木糖	250ml 摇瓶发酵	1.35 g/L	--	[13]
E. coli K235WXJ4	山梨醇	NaOH 控制 pH 6.4，15L 罐分批补料发酵	2.61 g/L	--	[16]
E. coli K1	木糖	分批补料发酵	0.95 g/L	--	[14]
E. coli CCTCC M208088	山梨醇	氨水控制 pH6.4，补料分批发酵，低磷酸盐（2.5 g/L）	5.20 g/L	16-50 kDa	[17]
E. coli K1	葡萄糖	分批补料发酵，控制葡萄糖 在 50 mg/L	1.35 g/L	--	[26]
E. coli CCTCC M208088	山梨醇	补料分批发酵，氨水控制前期 pH6.4，后期 pH7.4	5.65 g/L	260 kDa	[18]
E. coli SA9	葡萄糖	摇瓶发酵 补料控制葡萄糖 1 g/L	1.0 g/L 16.1 g/L	-- 113 kDa	[19]
E. coli CCTCC M208088	山梨醇	补料分批发酵，前期氨水/后期 KOH 控制 pH6.4	4.30 g/L	维持稳定在 90kDa	[20]

3 聚唾液的应用研究

3.1 蛋白/多肽药物的聚唾液酸修饰

目前聚唾液酸用于修饰蛋白主要是通过还原胺基化法，即将聚唾液酸非还原端相邻醇羟基氧化为醛基后（如图2所示），然后在还原剂氰基硼氢化钠等催化剂作用下与蛋白/酶上的氨基形成稳定的亚胺键。早在1996年Gregoriadis等[27]以10 kDa的聚唾液酸修饰过氧化氢酶，修饰程度为每个过氧化氢酶连接3.8个聚唾液酸，酶活保留率70%，K_m由修饰前的70.0 mM变为122.9 mM。1997年，Fernandes等[28]进一步将PSA用于修饰天冬酰胺酶，修饰程度为每个酶连接4.2-8.1个PSA，酶活保留率82%-86%，在37℃的小鼠血清中原始酶6 h后基本失活，而聚唾液酸修饰的天冬酰胺酶能保留65%-83%酶活，半衰期也提高了1.5倍。2003年，Jain等[29]以22 kDa和39 kDa 的聚唾液酸修饰胰岛素，修饰程度分别是1.60-1.74和2.37-2.45，小鼠体内测试降血糖药效由3 h提高到9 h。2008年，Constantinou等[30]分别用11 kDa和22 kDa PSA修饰抗肿瘤单克隆抗体 H17E2 Fab片段，使Fab在血液循环时间提高5倍，肿瘤吸收提高3倍，对肿瘤/血液选择性略微下降，对抗原胎盘碱性磷酸酶免疫活性影响较小。2009年， Constantinou等[31]进一步在药物蛋白C末端表达“甘氨酸-半胱氨酸”肽段，然后将非还原端氧化的PSA用马来亚酰胺与蛋白末端-SH联接，但该方法只能连接很少PSA。2010年，Zhang等[32]利用

PSA与胰岛素结合制备了PSA-胰岛素共聚物，使得胰岛素在体内的生物活性至少延长了两倍。2010年，本实验室Wu等[33]用16.2 kDa PSA以40:1摩尔比修饰超氧化物歧化酶，使得酶的耐酸碱、耐热和抗酶解能力显著提高。2016年，Wu等[34,35]进一步对Polysialylation方法改进，将PSA激活后连接到短链的双功能PEG上，再用于修饰免疫原性较强的尿酸酶，取得良好效果，主要优点是：PSA降低尿酸酶的免疫原性，不可降解的小分子PEG可以很容易通过肾和膀胱排出体外。

图 2 聚唾液酸活化示意图

Fig. 2 Schematic of activation of polysialic acid

3.2 组织工程材料

作为一种新型生物材料，聚唾液酸还可以作为支架材料应用在组织工程领域中。2007 年，Bruns 等[36]首次在胶原基质中加入 PSA 作为支架材料用于 Hep-G2 与 PC-12 细胞的培养，发现 PSA 能明显促进神经细胞增殖、粘附与伸展。Berski 等[37]考察了聚唾液酸水凝胶的生物降解能力，表明聚唾液酸水凝胶可生物降解并用于组织工程，并且添加胶原或聚赖氨酸可以提高材料性能。2008 年，Haile 等[38]在胶原、聚赖氨酸和聚鸟氨酸-层粘蛋白中加入 PSA 制备成凝胶培养雪旺细胞，结果显示这种凝胶支架材料能大大增强细胞的活力与粘附力。2012 年，Masand 等[39]发现 PSA-胶原复合凝胶对于周围神经再生具有促进作用，尤其能刺激神经细胞轴突的生长。2015 年，Williams 等[40]将 PSA 接枝到纳米孔二氧化硅材料上，降低了纳米二氧化硅的表面极性与细胞毒性，改善了纳米二氧化硅与有机体之间结合力差的缺陷，可作为神经组织工程支架材料。由于 PSA 具有独特的生物学功能，作为支架材料不仅可以诱导和支持神经原细胞再生，加速神经创伤的愈合，还无需进行二次手术，在体内可以被完全降解和吸收。

3.3 PSA 复合生物材料

2011 年 Bader 等[41]利用 PSA 侧链上的羧基与癸胺(DA)反应合成 PSA-DA 复合物，可用于包埋疏水性药物，用于靶向给药。2012 年，该团队的 Zhang 等[42]制备聚唾液酸-N 三甲基壳聚糖复合物，可形成纳米颗粒，对甲氨蝶呤具有明显缓释作用。2013 年，Greco 等[43]合成了 PSA-表阿霉素复合物，延长了表阿霉素的半衰期，释放率达到 40%，且对细胞有较低的毒性。2014 年 Wilson 等[44]使用 PSA 与聚己内酯(PCL)形成自组装胶束用于包裹环孢素用于治疗风湿性关节炎，载药率为 29.3±6.4%，载药量为 0.09±0.02 mg CyA/mg PSA-PCL，体外药物释放试验表明具有良好的缓释效果。另外也有研究把 PSA 与带正电的羧甲基壳聚糖复合制成水凝胶，可用于小分子药物的包埋[45]。2016 年国内西北农林科技大学段金友团队将制备的 pH 敏感、两亲性聚合物 PSA-U_2 胶束用于包埋紫杉醇，在酸性条件下，PSA 降解的同时紫杉醇能够被释放出来，随着 pH 的升高紫杉醇的

释放量减少，且包埋复合物对 SGC-7901 癌细胞具有强细胞毒性[46]。2017 年，Wu 等[47]将 PSA 氧化激活后用于修饰透明质酸，作为双相皮肤填充剂的外相，有效降低交联透明质酸的红肿刺激作用，并促进上皮细胞生长。最近，有较多研究者将 PSA 与非极性物质如十二烷基二甲基甜菜碱[48]、5β-胆酸[49]或硬脂胺[50]等反应形成两性材料，可自组装形成胶束或脂质体，用于输送抗癌药物或靶向脑部药物的输送基质。

4 总结与展望

唾液酸存在于动物及人体细胞外膜上糖蛋白或糖脂的末端，并以α2-3 或α2-6 糖苷键连接在半乳糖或半乳糖胺上，而唾液酸上非还原端 C7-C9 的醇羟基暴露于环境，非还原端的糖链结构对细胞免疫、粘附、信号传递等生物功能具有决定性作用。对动物细胞，在聚唾液酸转移酶酶作用下，可在唾液酸寡糖末端上继续延长形成 PSA，如与炎症相关的蛋白上 PSA 的聚合度在 20 dp 左右[51]。从大肠杆菌发酵可以获得大量聚唾液酸，分子量一般 200～800 dp 左右，也可以通过水解获得不同聚合度的聚唾液酸或寡聚唾液酸，满足不同领域生物材料的应用。

从目前 PSA 的应用情况来看，由于 PSA 上活性基团包括非还原端醇羟基、主链上的羧基、羟基和亚氨基，因此对其衍生化目前主要是两种方法：（1）将非还原端的 C7-C9 上邻醇羟基氧化形成醛基，然后再进一步和蛋白、linker 上的氨基等发生反应。这种方法消除了非还原端的醇羟基，可能失去细胞能识别的功能。这也可能是目前药物蛋白改性方法 Polysialylation 还一直无法替代 PEGylation 的主要原因，因为这种修饰方法带来的免疫原性降低幅度不是很大。（2）通过催化剂随机与 PSA 上的羧基、羟基进行反应，形成随机枝接、共混或交联的复合物。这种 PSA 修饰方法带有很强随机性和不可控性，不能确定到底连接到那些活性基团上。但是这种方法可能保留 PSA 非还原末端，只是复合物可能将大部分非还原端掩蔽。（3）在碱性条件下去除 N-乙酰神经氨酸 C5 位上乙酰基，形成-NH_2 用于联接到其它活性基团，但是这种方法使 N-乙酰神经氨酸结构破坏变成脱乙酰神经氨酸（KDN），而 KDN 并不存在人体中。

对于 PSA 在未来的应用研究，我们认为可以选择较合适化学反应方法或结合酶法来获得保留非还原端的 PSA，以保留其非还原端的糖链识别功能。方法 1，对 PSA 的还原端进行修饰改性以连接到一些 linker 或者其它物质上，获得类似细胞表面锚定的 PSA 大分子的存在形式。方法 2，从自然界如燕窝、蛋黄、鱼卵中获得唾液酸化寡糖，然后利用 CMP-唾液酸和聚唾液酸转移酶在末端唾液酸上进行延长获得类似 NCAM 上 PSA 结构。PSA 还原端是酮糖酸结构，一些苯二胺或酰肼能够与还原端羰基反应，但是这些方法目前仅用于聚唾液酸的检测。此外，对 PSA 化学氧化处理也不能太激烈，否则非还原端也会发生氧化，PSA 主链发生断裂[52]。关于 PSA 的应用领域越来越多，希望研究人员根据 PSA 特性找到更合适的应用方法，使 PSA 能大规模商业化应用。

Advance in Application of Polysialic Acid, a non-GAGs, non-Immunogenic Biomaterial

WU Jian-rong, Peng Xing-qiao, ZHAN Xiao-bei

(The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Polysialic acid is a strongly negatively charged, linear homopolymer linked by N-neuraminic acid, present in the human body, animal cells and a few pathogens. Polysialic acid is commonly found in glycoprotein (nerve cell adhesion molecules) and glycolipids. Polysialic acid is a non-glycosaminoglycan, non-immunogenic and biodegradable biomaterial. Polysialic acid can be used as biomaterials in tissue engineering and drug controlled release. Also it can also be compounded with other macromolecules to form multi-functional materials. In this paper, the biological functions, fermentative production and application of polysialic acid are reviewed, in order to provide a hint for the further application of polysialic acid.

Key words Polysialic acid, non-immunogenicity, biomaterial, drug controlled release

参考文献

[1] Azurmendi H F, Vionnet J, Wrightson L, et al. Extracellular structure of polysialic acid explored by on cell solution NMR. PNAS, 2007, 104:11557-11561.
[2]黎娜，王华锋，曾旭辉. 唾液酸对精子的作用. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(5): 734-739. Li N, Wang H F, Zeng X H. Chinese Journal of Cell Biology, 2015, 37(5): 734-739.
[3] Tecle E, Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. Mol Reprod Dev, 2015, 82(9): 635-650.
[4] Miyata S, Sato C, Kitamura S, et al. A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an α2,9-linked poly-*N*-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-*O*-sulfated sialic acid residue. Glycobiology, 2004, 14(9): 827-840.
[5] Cress B F, Englaender J A, He W, et al. Masquerading microbial pathogens capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. FEMS Microbiol Rev, 2014, 38(4): 660-697.
[6] McGowen M M, Vionnet J, Vann W F. Elongation of alternating alpha 2,8/2,9 polysialic acid by the *Escherichia coli* K92 polysialyltransferase. Glycobiology, 2001, 11(8): 613-620.
[7] Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(3): 195-208.
[8] Yabe U, Sato C, Matsuda T, et al. Polysialic acid in human milk CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. J Biol Chem, 2003, 278(16):13875-13880.
[9] Simon P, Baumner S, Busch O, et al. Polysialic acid is present in mammalian semen as a posttranslational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII. J Biol Chem, 2013, 288(26): 18825-18833.
[10] Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, et al. Expression of polysialic acid and STX， a human polysialyltransferase， is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer． Cancer Res, 2000, 60(11): 3072-3080．
[11] Sato C, Kitajima K. Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. J Bioechm, 2013, 154(2): 115-136．
[12] Murray H C, Low V F, Swanson M E, et al. Distribution of PSA-NCAM in normal, Alzheimer's and Parkinson's disease human brain. Neuroscience, 2016, 330(8): 359-375.
[13] Rodriguez-Aparicio L B, Reglero A, Ortiz A I, et al. Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 27(5): 474-483.
[14] Rode B, Endres C, Ran C, et al. Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1. J Biotechnol, 2008, 135(2): 202-209.
[15] Kapre S V, Shaligram U. Process for the preparation of highly pure polysialic acid of high molecular weights: WO Patent, 0353732008. 2012
[16] Zhan XB, Zhu L, Wu JR, et al. Production of polysialic acid from fed-batch fermentation with pH control. Biochem Eng J, 2002, 11(2-3): 201-204.
[17] Wu JR, Liu JL, Zhan XB, et al. Enhancement of polysialic acid yield by reduction of initial phosphate and feeding of ammonia water with *Escherichia coli* CCTCC M208088. Biotechnol Bioproc Eng, 2010, 15(4): 657-663.
[18] Zheng ZY, Wang SZ, Li GS, et al. A new polysialic acid production process based on dual-stage pH control and fed-batch fermentation for higher yield and resulting high molecular weight product. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(6): 2405-2412.
[19] Chen F, Tao Y, Jin C, et al. Enhanced production of polysialic acid by metabolic engineering.

Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(6): 2603-11.
[20]付旭东,吴剑荣,蒋芸,等.乙酸与钾离子强度对聚唾液酸合成及过程分子量变化的影响.食品与发酵工业. 2017, doi:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.013824.
Fu X D, Wu J R, Jiang Y, et al. Food and Fermentation Industries, 2017, DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.013824
[21] Puente-Polledo L, Reglero A, González-Clemente C, et al. Biochemical conditions for the production of polysialic acid by *Pasteurella haemolytica* A2. Glycoconjugate J, 1998, 15(9): 855-861.
[23] Lin S L, Inoue Y, Inoue S. Evaluation of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed electrochemical and fluorometric detection for extensive application to the analysis of homologous series of oligo- and polysialic acids in bioactive molecules. Glycobiology, 1999, 9(8): 807-814
[24] Nomoto H, Iwasaki M, Endo T, et al. Sturctures of carbohydrate units isolated from Trout egg polysialoglycoproteins: short-cored units with oligosialosyl groups. Arch Biochem Biophys, 1982, 218(1): 335-341.
[25] Liu J L, Zhan X B, Wu JR, et al. An efficient and large-scale preparation process for polysialic acid by *Escherichia coli* CCTCC M208088. Biochem Eng J, 2010**,** 53(1): 97-103.
[26] Chen R, John J, Rode B, et al. Comparison of polysialic acid production in *Escherichia coli* K1 during batch cultivation and fed-batch cultivation applying two different control strategies. J Biotechnol, 2011, 154(4): 222-229.
[27] Fernandes A I, Gregoriadis G. Synthesis, characterization and properties of sialylated catalase. Biochim Biophy Acta, 1996, 1293(1): 90-96.
[28] Fernandes A I, Gregoriadis G. Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics. Biochim Biophy Acta, 1997, 1341(1): 26-34.
[29] Jain S, Hreczuk-Hirst D H, McCormack B, et al. Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo. Biochim Biophy Acta, 2003, 1622(1): 42-49.
[30] Constantinou A, Epenetos A A, Hreczuk-Hirst D, et al. Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation. Bioconjug Chem, 2008, 19(3): 643-650.
[31] Constantinou A, Epenetos A A, Hreczukhirst D, et al. Site-specific polysialylation of an antitumor single-chain Fv fragment. Bioconjug Chem, 2009, 20(5): 924-931.
[32] Zhang R S, Jain S, Rowland M, et al. Development and testing of solid dose formulations containing polysialic acid insulin conjugate: next generation of long-acting insulin. J Diabetes Sci Technol, 2010, 4(3): 1-8.
[33] Wu J R, Lin Y, Zheng Z Y, et al. Improvement of the CuZn-superoxide dismutase enzyme activity and stability as a therapeutic agent by modification with polysialic acids. Biotechnol Lett, 2010, 32(12): 1939-45.
[34] Wu J R, Lu S Z, Zhan X B, et al. Modification with polysialic acid-PEG copolymer as a new method for improving the therapeutic efficacy of proteins. Prep Biochem Biotechnol, 2016**,** 46(8): 788-797.
[35**]** Wu J R, Zhan X B, Lin Y． Preparation and application of PEG-PSA block copolymer: CN Patent, 201010111612.X. 2008
[36] Bruns S, Stark Y, Poker S, et al. Collagen biomaterial doped with colominic acid for cell culture applications with regard to peripheral nerve repair. Biomaterial, 2007, 28(131): 335-345.
[37] Berski S, van Bergeijk J, Schwarzer D, et al. Synthesis and biological evaluation of a polysialic acid-based hydrogel as enzymatically degradable scaffold material for tissue engineering. Biomacromolecules, 2008, 9(9): 2353-2359.
[38] Haile Y, Berski S, G D, et al. The effect of modified polysialic acid based hydrogels on the adhesion and viability of primary neurons and glial cells. Biomaterials, 2008, 29(12): 1880-1891.
[39] Masand S N, Chen J, Perron I J, et al. The effect of glycomimetic functionalized collagen on peripheral nerve repair. Biomaterials, 2012, 33(33): 8353-8362.
[40] Williams S, Neumann A, Bremer I, et al. Nanoporous silica nanoparticles as biomaterials: evaluation of different strategies for the functionalization with polysialic acid by step-by-step cytocompatibility testing. J Mater Sci-Mater M, 2015, 26(3): 125-141.
[41] Bader R A, Silvers A L, Zhang N. Polysialic acid-based micelles for encapsulation of hydrophobic drugs. Biomacromolecules, 2011, 12(2): 314-320.
[42] Zhang N, Bader R A. Synthesis and characterization of polysialic acid-N-trimethyl chitosan

nanoparticles for drug delivery. Nano LIFE, 2012, 2(3): 1241003.
[43] Greco F, Arif I, Botting R, et al. Polysialic acid as a drug carrier: evaluation of a new polysialic acid-epirubicin conjugate and its comparison against established drug carriers. Polym Chem-UK, 2013, 4(5): 1600-1609.
[44] Wilson D R, Zhang N, Silvers A L, et al. Synthesis and evaluation of cyclosporine A-loaded polysialic acid-polycaprolactone micelles for rheumatoid arthritis. Eur J Pharm Sci, 2014, 51(1): 146-156.
[45] Wu JR, Zhan XB, Zheng ZY, et al. Synthesis and characterization of polysialic acid/carboxymethyl chitosan hydrogel with potential for drug delivery. Russ J Bioorg Chem, 2015, 41(5): 562-567.
[46] Zhang W X, Dong D Q, Li P, et al. Novel pH-sensitive polysialic acid based polymeric micelles for triggered intracellular release of hydrophobic drug. Carbohyd Polym, 2016, 139(3): 75-81.
[47] Wu J R, Fu H, Zhan X B, et al. Preparation and characterization of a novel polysialic acid-hyaluronan graft copolymer potential as dermal filler. Int J Biol Macromol, 2017, 99(6): 692-698.
[48] Zhang T, Zhou S, Hu L, et al. Polysialic acid-modifying liposomes for efficient delivery of epirubicin, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. Int J Pharmaceut, 2016, 515(1-2): 449-459.
[49] Jung B, Shim M K, Park M J, et al. Hydrophobically modified polysaccharide-based on polysialic acid nanoparticles as carriers for anticancer drugs. Int J Pharmaceut, 2017, 520(1-2): 111-118.
[50] Wang X J, Gao Y P, Lu N N, et al. Endogenous polysialic acid based micelles for calmodulin antagonist delivery against vascular dementia. Acs Appl Mater Inter, 2016, 8(51): 35045-35058.
[51] Shahraz A, Kopatz J, Mathy R, et al. Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. Sci Rep-UK, 2015, 5: 16800.
[52] Neyra C, Paladino J, Le B M. Oxidation of sialic acid using hydrogen peroxide as a new method to tune the reducing activity. Carbohyd Res, 2014, 386(316): 92-98.